



**Departamento de Ciências Biológicas**  
**Universidade Federal de São Paulo**  
**Campus Diadema**

**JANAINA GREEN**

**DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA COFILINA NA  
REGULAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DE AKT EM  
CÉLULAS DE MELANOMA DA LINHAGEM A2058**

**DIADEMA, SP**

**2018**

**JANAINA GREEN**

**DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA COFILINA NA  
REGULAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DE AKT EM  
CÉLULAS DE MELANOMA DA LINHAGEM A2058**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como exigência parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Farmácia,  
ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas  
e Farmacêuticas da Universidade Federal de  
São Paulo – Campus Diadema.

Orientador: Profº Dr. Joel Machado Júnior

**DIADEMA, SP**

**2018**

Green, Janaina

**Determinação da Participação da Cofilina da Regulação da  
Translocação Nuclear de Akt em Células de Melanoma da  
Linhagem A2058/ Janaina Green – Diadema, 2018.**

31f

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)-  
Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2018.

Orientador: Profº Dr. Joel Machado Junior

1.Actina 2. Câncer 3.Núcleo 4.MAPK I. Título

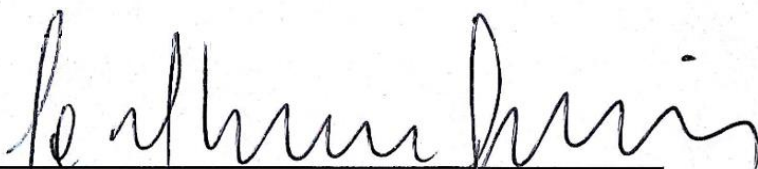
CDD 571.6

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Aprovado em:

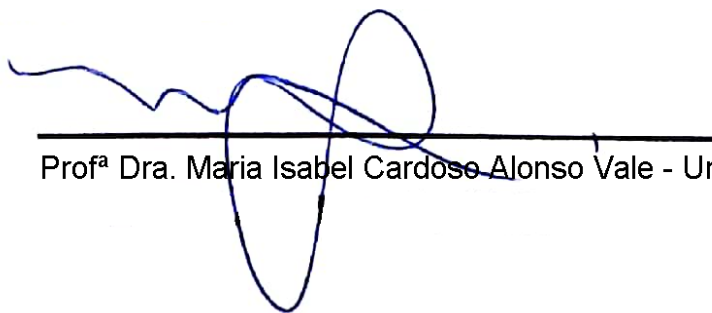
19 / 06 / 2018

Banca Examinadora:



---

Prof<sup>o</sup> Dr. Joel Machado Junior - Universidade Federal de São Paulo



---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Isabel Cardoso Alonso Vale - Universidade Federal de São Paulo



---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Fabíola Freitas de Paula Lopes - Universidade Federal de São Paulo

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, por acordarem cedo e dormirem tarde comigo nesses 5 anos de faculdade.

A Tati, que me deu um curso de inglês.

Ao Gabriel, por me deixar usar sua cadeira confortável quando estava escrevendo meu trabalho.

A Larissa, que me ensinou todas as atividades do laboratório.

Ao Profº Joel, por toda a atenção que dedicou a mim.

Ao PIBIC pela bolsa de Iniciação Científica.

## RESUMO

A via PI3K-AKT é uma das principais vias de sinalização envolvida na regulação de diferentes processos celulares como metabolismo, crescimento e sobrevivência, e se encontra frequentemente desregulada em melanomas. Apesar do papel fisiológico de AKT ser bem definido no citoplasma celular, AKT também é encontrado no núcleo de diferentes tipos celulares, mas pouco é conhecido sobre os mecanismos que controlam sua localização e função no núcleo. Recentemente, estudos no nosso laboratório mostraram que AKT se encontra no núcleo de células de melanoma da linhagem A2058, onde interage com  $\beta$ -actina. Considerando as seguintes premissas: (1) AKT não apresenta seqüência de localização nuclear e seu transporte para núcleo ainda não foi definido; (2) a translocação nuclear da  $\beta$ -actina é mediada pela cofilina, uma proteína ligante de actina no citoplasma, e (3) AKT e  $\beta$ -actina interagem no núcleo das células da linhagem de melanoma A2058, esse trabalho teve como objetivo determinar a possível associação da cofilina com o complexo AKT/ $\beta$ -actina, bem como avaliar a sua participação como mediador da translocação nuclear de AKT em associação com a  $\beta$ -actina. Para testar essa hipótese, realizamos ensaios de immunoblotting para determinar a localização da cofilina no núcleo das células A2058 e, por meio de ensaios de imunofluorescência confocal, a sua interação com AKT nuclear. Nossos resultados mostraram que a cofilina se encontra no núcleo das células A2058 e colocaliza com o AKT e  $\beta$ -actina, sugerindo um possível papel da cofilina em conjunto com a  $\beta$ -actina na regulação do transporte de AKT para o núcleo.

Palavras-chave: Actina. Câncer. Núcleo. MAPK. PI3K.

## **ABSTRACT**

The PI3K-AKT pathway is one of the most important signaling events involved in the regulation of different cellular processes such as metabolism, growth and survival, and is often dysregulated in melanomas. Although the physiological role of AKT in the cellular cytoplasm is well understood, AKT is also found in the nucleus of different cell types, but not much is known about the mechanisms that control its location and function in the nuclear compartment. Recently, studies in our laboratory have shown that AKT is found in the nucleus of A2058 melanoma cells, where it interacts with  $\beta$ -actin. Considering the following assumptions: (1) AKT lacks a nuclear localization sequence and its transport to the nucleus has not yet been defined; (2) Nuclear translocation of  $\beta$ -actin is mediated by cofilin, and (3) AKT and  $\beta$ -actin interact in the nucleus of A2058 melanoma cells; the purpose of the present study was to determine if cofilin interacts with the AKT/ $\beta$ -actin complex and to evaluate its possible role as a mediator of AKT nuclear translocation in association with  $\beta$ -actin. To test this hypothesis, we performed immunoblotting assays to determine the location of cofilin in the nucleus of A2058 cells. By using confocal immunofluorescence assays, it was possible to evaluate the interaction of cofilin with AKT and  $\beta$ -actin. Our results showed that cofilin is found in the nucleus of A2058 cells and colocalizes with either AKT and  $\beta$ -actin, suggesting a possible role of cofilin and  $\beta$ -actin in the regulation of AKT nuclear transport.

Key-words: Actin. Cancer. Nucleus. MAPK. PI3K.

## LISTA DE ABREVIações

**ABP:** Proteína de ligação a actina;

**ADP:** adenosina difosfato;

**ADF:** Fator de despolimerização da actina;

**ATP:** adenosina trifosfato;

**Arp:** Proteínas relacionadas a actina;

**BAD:** proteína pró-apoptótica;

**Bcl-2:** linfoma de células B 2 – Proteína anti-apoptótica;

**CDK:** Quinase dependente de ciclina – Reguladores do ciclo celular;

**CHO:** célula de ovário de hamster chinês;

**CREB:** cAMP response element-binding protein – Fator de transcrição;

**ERK:** (MAPK) Proteína Quinase Ativada por Mitógenos;

**FOXO:** Forkhead box O;

**GSK-3:** glicogênio sintase quinase;

**HEK293:** célula embrionária de rim humano;

**HepG2:** células de câncer de fígado;

**HT1080:** células de fibrosarcoma;

**IGF-1:** fator de crescimento semelhante a insulina 1;

**IκB-quinase (IKK):** inibidor kappa quinase;

**MEK:** (MAPKK) Proteína Quinase quinase Ativada por Mitógenos;

**mTORC2:** proteína alvo da rapamicina em mamíferos 2;

**NES:** sinal de exportação nuclear;

**NFκB:** Fator nuclear Kappa B – Fator de transcrição;

**NGF:** fator de crescimento neuronal;

**NLS:** sinal de localização nuclear;

**MCF-7:** Células de câncer de mama humano;

**MDM2:** murine double minute 2 – Proteína oncogênica;

**p21:** inibidor de CDK;

**p27:** inibidor de CDK;

**PC12v:** célula de medula adrenal de rato;

**PDGF:** fator de crescimento derivado de plaquetas humanas;

**PDK-1:** proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos;

**PH domínio:** domínio de homologia a plectrina;

**PI3K:** fosfatidil-inositol-3-quinase;

**PKB:** Proteína Quinase B;

**PIP2:** fosfatidil-inositol-2-fosfato;

**PIP3:** fosfatidil-inositol-3-fosfato;

**PTEN:** fosfatase homóloga a tensina;

**RAF:** (MAPKKK) Proteína Quinase quinase Ativada por Mitógenos;

**TCL1:** proteína presente em células T;

**T47-D:** Células de câncer de mama humano.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	8
Vias de sinalização alteradas em Melanoma .....	8
AKT nuclear .....	11
Actina e proteínas de ligação a actina (ABPs) .....	13
Hipótese .....	16
OBJETIVO.....	17
Objetivos Específicos .....	17
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
Cultura Celular .....	18
Extratos Citoplasmáticos e Nucleares .....	18
Dosagem de Proteínas.....	19
SDS-PAGE e Immunoblotting.....	19
Imunofluorescência Confocal .....	20
RESULTADOS .....	21
Determinação de cofilina no núcleo das células A2058 .....	21
Determinação da interação de cofilina com AKT e $\beta$ -actina.....	23
DISCUSSÃO .....	25
CONCLUSÃO .....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

## INTRODUÇÃO

### Vias de sinalização alteradas em Melanoma

O melanoma é a forma mais letal de câncer de pele, origina-se pela transformação maligna dos melanócitos, células pigmentadas da pele (Smalley, 2010). Sua incidência para o ano de 2018 tem estimativa de 2.920 casos em homens e 3.340 casos em mulheres, segundo dados do INCA.

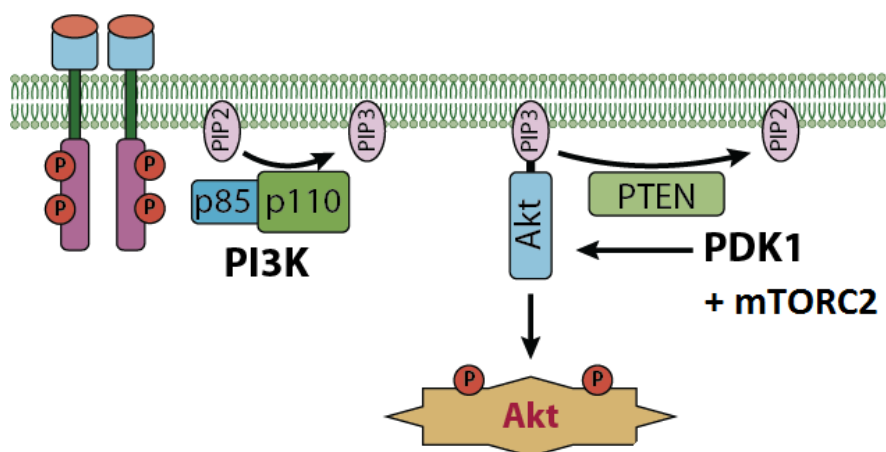
A detecção precoce do melanoma é fundamental, com a remoção das lesões primárias representando uma possibilidade de cura. Entretanto, no caso de metástase, o melanoma se torna um grande problema, pois ainda não existe tratamento eficaz (Smalley, 2010; Stahl *et al.*, 2004). Além disso, a ocorrência de metástase leva rapidamente ao óbito em praticamente todos os pacientes com diagnóstico tardio, já que o tratamento é limitado (Stahl *et al.*, 2004).

O padrão de alteração genética no melanoma sugere que a ativação de vias de sinalização possui uma importante função para o início e desenvolvimento dessa doença (Davies *et al.*, 2008). A via das MAP quinases se encontra frequentemente mutada em melanoma (Smalley, 2010). Essa via está envolvida em processos como proliferação e sobrevivência e, em células não-tumorais, é ativada após o estímulo de receptores tirosina quinase, com a consequente ativação da proteína Ras, a qual promove a cascata de fosforilação das MAP quinases através da ativação de RAF (Alberts *et al.*, 2011; Steelman, L.S. *et al.*, 2011). As mutações mais comuns encontradas no melanoma ocorrem em oncogenes, como B-RAF, o qual se encontra mutado em pelo menos 60% dos melanomas, e N-RAS, mutado em cerca de 15% a 20% dos melanomas (Davies *et al.*, 2008; Smalley, 2010). Ocorrem também mutações em genes supressores de tumor, como PTEN, mutado em cerca de 30% a 50% dos casos de melanoma (Goel *et al.*, 2006). Essas mutações podem levar à ativação constitutiva da via das MAP quinases e da via PI3K/AKT, as quais, atuando em conjunto, conferem um fenótipo mais agressivo (Manning e Cantley, 2007; Smalley, 2010).

## Via PI3K/AKT

AKT é uma proteína serina/treonina quinase de 59 kDa composta pelos domínios N-terminal homólogo à pleckstrina (PH), domínio quinase e domínio C-terminal hidrofóbico (Wang e Brattain.,2006). Pertence à família AGC de proteínas quinase, na qual estão inseridas também as proteínas quinase A, G e C (Manning e Cantley, 2007). Sua ativação se dá pela via PI3K/AKT, que é ativada através do estímulo de receptores tirosina quinase na membrana celular. A quinase PI3K interage com os receptores ativados e induz a fosforilação de fosfoinosítídeos de membrana como PIP2 (Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) em PIP3 (Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), uma reação que pode ser revertida pela fosfatase PTEN. Proteínas portadoras do domínio PH, como é o caso de AKT e PDK-1, interagem com PIP3 e, uma vez ligadas na membrana, PDK1 fosforila AKT no resíduo de treonina 308. A completa ativação de AKT se dá com a fosforilação do resíduo serina 473 pelo complexo mTORC2 (Smalley, 2010; Wang e Brattain, 2006) (Fig.1). Além de receptores tirosina quinase, receptores ligados à proteína G e proteínas oncogênicas como RAS podem levar à ativação de PI3K e consequentemente ativar AKT (Dienstmann *et al.*, 2014).

**Figura 1: Ativação da via PI3K/AKT:** Receptores tirosina quinase na membrana celular recrutam PI3K, que fosforila PIP2 (Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) em PIP3 (Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), reação que pode ser revertida pela fosfatase PTEN. AKT e PDK-1 se associam à membrana e PDK1 fosforila AKT, que é totalmente ativado após uma segunda fosforilação pelo complexo mTORC2.

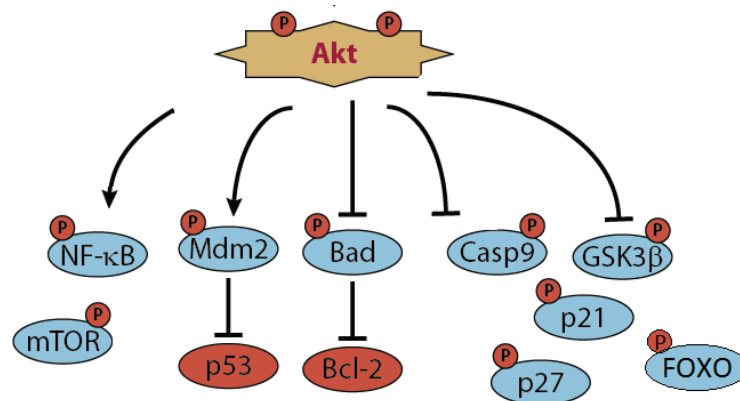


Fonte: (Schitteck e Meier). Disponível em <http://www.sfb773.de/html/projectC5.html>; Acesso em jul 2016

AKT está envolvida em diversos eventos celulares, como sobrevivência, crescimento e divisão celular (Wang e Brattain, 2006), exercendo sua função através da fosforilação de substratos localizados predominantemente no citoplasma. Dentre os inúmeros substratos de AKT, estão bem caracterizados, por exemplo, a proteína BAD, o complexo mTORC1, GSK3, I $\kappa$ B-quinase (IKK), procaspase-9, CREB, p21 e p27 (Nicholson e Anderson, 2002; Manning e Cantley, 2007). BAD é uma proteína pró-apoptótica que, na forma desfosforilada, bloqueia Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica. A fosforilação induzida por AKT torna BAD inativa e impede a apoptose (Alberts *et al.*, 2011). A atividade pró-sobrevivência de AKT é reforçada pela ativação de MDM2, uma ubiquitina ligase que induz a degradação de p53, uma proteína supressora de tumor associada à apoptose (Mayo e Donner, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Além disso, como revisado por Manning e Cantley, AKT participa da regulação de mTORC1, complexo proteico envolvido no crescimento celular, enquanto a fosforilação em GSK3 leva ao aumento da síntese de glicogênio e lipídeos (Manning e Cantley, 2007, Wullschleger *et al.*, 2006). AKT também fosforila p21 e p27, reguladores negativos de CDKs, promovendo sua retenção no citoplasma e estimulando o ciclo celular (Nicholson e Anderson, 2002; Wang e Brattain.,2006). Além disso, AKT pode ativar indiretamente o fator de transcrição NF $\kappa$ B, capaz de

induzir genes que controlam respostas proliferativas e bloqueiam vias apoptóticas (Mayo e Baldwin, 2000). Membros da família Forkhead/FOXO de fatores de transcrição também foram identificadas como substratos para AKT (Scheid e Woodgett, 2001). A fosforilação de FOXO induz sua retenção no citoplasma, impedindo assim a transcrição de genes pró-apoptóticos como Bim e FasL (Burgering e Medema, 2003; Manning e Cantley, 2007). A Figura 2 ilustra alguns dos diferentes substratos de AKT já identificados.

**Figura 2: Substratos de AKT.** A fosforilação mediada por AKT pode levar a ativação ou inativação de inúmeros substratos.



Fonte: (Schitteck e Meier). Disponível em <http://www.sfb773.de/html/projectC5.html>; Acesso em jul 2016

## AKT nuclear

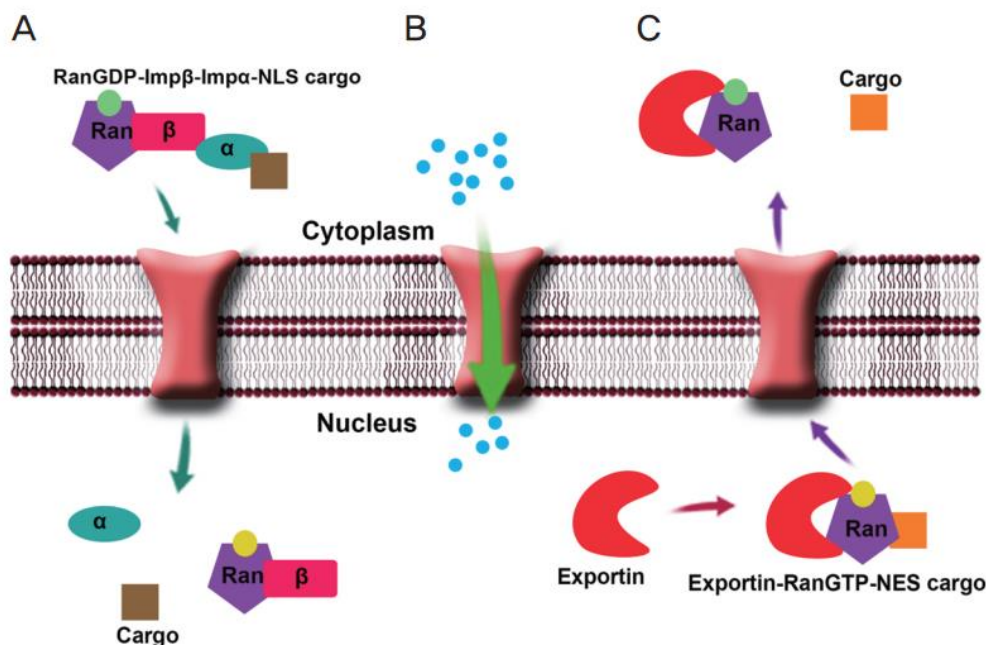
Apesar da atuação de AKT sobre substratos localizados no citoplasma estar bem descrita na literatura, diversos estudos mostram a presença de AKT no núcleo celular. Por exemplo, foi demonstrado que AKT se encontra concentrado no núcleo de células HepG2 (carcinoma hepatocelular), HT1080 (fibrosarcoma) e células tumorais foliculares (Toker e Newton, 2000; Vasko *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2001). Por outro lado, em linhagens celulares não-tumorais, como CHO (ovário de hamster), HEK293 (rim de embrião humano) e PC12v (medula suprarrenal de rato), AKT está quase que exclusivamente localizada no citoplasma (Andjelkovic *et al.*, 1997; Borgatti *et al.*, 2003). Esses achados sugerem uma possível função de AKT nuclear na

patogenia de tumores. Além disso, alguns trabalhos mostraram a migração de AKT para o núcleo após estímulos como soro (Meier *et al.*, 1997), ativação de linfócitos B (Astoul, Watton e Cantrell, 1999), estimulação mitogênica com IGF-1 ou PDGF (Borgatti *et al.*, 2000) e tratamento com NGF (Salinas *et al.*, 2000).

Não se sabe ao certo se AKT necessita de fosforilação para que ocorra sua entrada no núcleo. Em um estudo feito em células HEK293 contendo AKT mutado nos resíduos T308 e S473, ou seja, nos sítios de fosforilação, foi observada a migração de AKT para o núcleo, sugerindo que a fosforilação de AKT não é necessária para a sua localização nuclear (Saji *et al.*, 2005). Por outro lado, AKT mutado em T308 e S473 não foi observado no núcleo de células PC12 estimuladas com NGF (Nguyen *et al.*, 2006). Componentes essenciais para a fosforilação de AKT, como por exemplo PI3K, PIP3, PDK1 e mTORC2, já foram encontrados no núcleo de diferentes células (Martelli *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que AKT pode ser ativado diretamente no núcleo após o estímulo com IGF-1 (Wang e Brattain, 2006), sugerindo que o transporte nuclear de AKT não está restrito ao seu *status* de fosforilação, mas principalmente dependente da associação com outras proteínas que promovem o seu transporte.

A função de AKT no compartimento celular bem como seu mecanismo de translocação ainda não estão esclarecidos. De modo geral, o tráfego de moléculas entre citoplasma e núcleo ocorre através de poros nucleares, estruturas proteicas que formam um canal na membrana nuclear (Fig.3). Partículas pequenas fluem livremente pelos poros, mas cargas maiores que 40 kD requerem receptores de transporte específicos, as importinas e exportinas, que reconhecem cargas portadoras de sequências características de aminoácidos denominadas NLS (sinal de localização nuclear) e NES (sinal de exporte nuclear) (Terry, Shows e Wentz, 2007). AKT possui 59 kD e não apresenta NLS (Wang e Brattain, 2006), logo, sua translocação nuclear não é mediada por processos convencionais.

**Figura 3: Transporte Nuclear.** (A) Cargas maiores que 40 kDa portadoras de NLS (sinal de localização nuclear) atravessam o poro nuclear através da interação com importinas; (B) Cargas com até 40 kDa atravessam o poro nuclear de forma passiva; (C) Cargas maiores que 40 kDa portadoras NES (sinal de exporte nuclear) podem atravessar os poros nucleares através da interação exportinas. O processo é regulado pelo gradiente de Ran-GTP/Ran-GDP.



Fonte: (Dhanasingh, I. 2015).

Estudos realizados no nosso laboratório mostraram a presença de AKT nuclear em células de melanoma humano da linhagem A2058 e análises por espectrometria de massas identificaram a interação entre AKT e  $\beta$ -actina no núcleo dessas células. Estudos de co-imunoprecipitação e imunofluorescência confocal confirmaram a interação entre o AKT nuclear e  $\beta$ -actina (Coa L.L. *et al*, manuscrito submetido). Esses achados levantaram questões sobre o papel da actina na localização de AKT nessas células.

### Actina e proteínas de ligação a actina (ABPs)

A actina é uma proteína presente no citoesqueleto de células eucarióticas, altamente concentrada no córtex celular, onde participa de diversos processos como motilidade celular, crescimento, citocinese, endocitose, exocitose e transdução de sinais (revisado por Xu, Kanagaratham e Radzioch, 2012). A actina pode se

apresentar nas formas monomérica (Actina-G) e polimérica (Actina-F), a forma monomérica possui estrutura globular e uma fenda central com sítio de ligação de ATP, que é essencial para polimerização ocorrer. A actina-F consiste em dois filamentos de actina que interagem formando uma estrutura helicoidal que possui polaridade, ou seja, os monômeros se associam de forma ordenada, formando um filamento com extremidades bem definidas, chamadas de extremidade “menos” e extremidade “mais” (Alberts *et al.*, 2011; Pollard e Brorisy, 2003; Pollard e Cooper, 1986). Os filamentos de actina são estruturas dinâmicas, podem formar diferentes estruturas, como feixes, redes e géis, dependendo das proteínas com as quais interage (Alberts *et al.*, 2011). Assim, as funções exercidas pela actina dependem da constante polimerização e despolimerização.

De maneira simplificada, a formação de filamentos de actina depende da disponibilidade de monômeros associados com ATP. Inicialmente, ocorre a nucleação, que é a associação de monômeros, seguida pelo alongamento. Conforme os monômeros se associam, pode ocorrer a hidrólise do ATP a ADP, o que promove a despolimerização (Alberts *et al.*, 2011, Pollard e Cooper, 1986). Diversas proteínas regulam a dinâmica de polimerização da actina, são as chamadas proteínas de ligação a actina ou ABPs – do inglês “Actin binding proteins” –, entre elas estão a profilina (Schluter *et al.*, 1997), o complexo Arp2/3 (Pollard e Beltzner, 2002) e cofilina/ADF (Bamburg *et al.*, 1999). O Complexo Arp2/3 promove a nucleação e formação de um novo filamento. A profilina auxilia na disponibilidade de ATP-actina para alongamento dos filamentos, visto que ela cataliza a troca de ADP por ATP dos monômeros e, além disso, bloqueia a extremidade “mais” dos monômeros, promovendo o alongamento dos filamentos. A Cofilina/ADF possui afinidade pela ADP-actina e provoca a despolimerização dos filamentos (Pollard e Brorisy, 2003).

A presença de actina nuclear começou a ser investigada recentemente, pois por muito tempo não se aceitou a hipótese de actina conter alguma função nuclear, mas de se tratar unicamente de uma proteína citoplasmática. (Pederson e Aebi, 2002; Xu, Kanagaratham e Radzioch, 2012). Entretanto, já se sabe que actina participa de processos fundamentais no núcleo, entre eles o remodelamento da cromatina (Olave *et al.*, 2002), o processamento de RNA (Percipalle *et al.*, 2002), iniciação e alongamento da transcrição, bem como associação com todas as RNA polimerases (Xu, Kanagaratham e Radzioch, 2012).

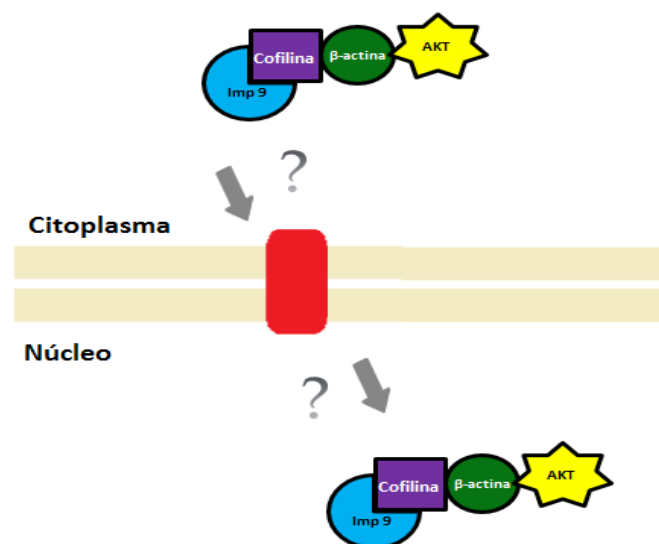


Assim como AKT, a actina não apresenta NLS e seu peso molecular, 43 kDa, está no limite para o transporte passivo através do poro nuclear (Xu, Kanagaratham e Radzioch, 2012). Em estudos recentes, verificou-se que a translocação nuclear da actina é um evento que requer energia, ou seja, o peso molecular de 43 kDa não permite o transporte passivo através dos poros nucleares (Dopie *et al.*, 2012; Stuken, Hartmann e Gorlich, 2003). Também foi demonstrado que o transporte de actina para o núcleo é mediado pela importina 9 e que a cofilina deve estar presente para ocorrer a interação de actina com importina 9 (Dopie *et al.*, 2012). A cofilina possui sequência de NLS e domínio de ligação a actina localizados em sítios opostos (Bamburg, 1999), o que permite a ligação concomitante de importinas e actina, possibilitando o transporte da actina para o compartimento nuclear.

## Hipótese

Considerando que: (1) AKT não apresenta sequência de localização nuclear e seu transporte para núcleo ainda não foi definido; (2) A translocação nuclear da  $\beta$ -actina é mediada pela cofilina e (3) AKT e  $\beta$ -actina interagem tanto no citoplasma quanto no núcleo, hipotetizamos que o transporte nuclear de AKT pode ser mediado pelo complexo  $\beta$ -actina-cofilina, o qual se ligaria a AKT no citoplasma induzindo a sua translocação para núcleo (Fig.4).

**Figura 4: Hipótese do transporte nuclear de AKT.** AKT se ligaria ao complexo  $\beta$ -actina/cofilina no citoplasma e, através da importina 9, seria transportada para o núcleo.



Fonte: Elaborado pela autora.

## **OBJETIVO**

Investigar o papel da cofilina como possível mediador da translocação nuclear de AKT em células de melanoma da linhagem A2058.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar a presença de cofilina no núcleo das células A2058;
2. Determinar a interação de cofilina com AKT e  $\beta$ -actina.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Cultura Celular**

Células da linhagem A2058, que possui mutação em BRAF (BRAF<sup>V600E</sup>) e deleção de PTEN, foram cultivadas e incubadas em meio RPMI pH 6,9, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. As células foram cultivadas até atingir 80% de confluência para realização dos ensaios. O meio foi trocado para meio RPMI pH 6,9, contendo 1% de antibiótico (sem soro fetal bovino) por 24 horas e, em seguida, as células foram separadas em dois grupos: 1) Não estimuladas: As células foram mantidas nas mesmas condições; 2) Estimuladas: O meio foi trocado para meio RPMI pH 6,9, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico durante 30 minutos.

### **Extratos Citoplasmáticos e Nucleares**

Após o cultivo, as células foram coletadas com tripsina e centrifugadas por 5 min, 1500 rpm a 4°C. Depois de duas lavagens com PBS 1x gelado, o pellet foi ressuscitado em 150µL de tampão citoplasmático (10mM Hepes pH8,0, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 200mM Sacarose, 0,5% NP 40, 0,5mM PMSF e 1x Inibidor de protease e fosfatase) e incubado 10 minutos em gelo, vortexando a cada 2 minutos e então as células foram centrifugadas por 5 minutos, 3000rpm a 4°C e o sobrenadante (extrato citoplasmático) foi armazenado e estocado. O pellet foi ressuscitado em 500 µL em tampão de lavagem (10mM Hepes pH8,0, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 200mM Sacarose, 0,5mM PMSF) e centrifugado por 5 minutos, 3000rpm a 4°C. O procedimento de lavagem foi repetido e o pellet obtido foi ressuscitado em 70µL de tampão nuclear (20mM Hepes pH8,0, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 420mM NaCl, 0,2mM EDTA, 0,5mM PMSF e 1x Inibidor de protease e fosfatase) e incubado em gelo por 25 minutos, vortexando a cada 5 minutos. As membranas nucleares foram rompidas por choque térmico através de congelamento e descongelamento em gelo seco e metanol por 10 vezes, seguido por centrifugação por 30 minutos, 12000rpm a 4°C para obtenção do extrato nuclear (sobrenadante). Os

extratos foram utilizados imediatamente ou armazenados a -80°C. A concentração das proteínas foi avaliada pelo método Bradford (Bio-Rad)

### **Dosagem de Proteínas**

Soluções padrão contendo albumina bovina (BSA) foram preparadas nas concentrações 0.2, 0.4, 0.6 e 0.8 µg/µL para a curva de calibração. Em seguida, os extratos citoplasmáticos e nucleares foram diluídos na proporção de 1:10. As soluções foram pipetadas em duplicata em placa de 96 well contendo o reagente Quick Start™ Bradford Dye Reagent, 1x, que muda da cor vermelha para azul após interagir com proteínas. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de microplacas Epoch Biotek com  $\lambda = 595$  nm.

### **SDS-PAGE e Immunoblotting**

Utilizou-se 50 µg de proteínas dos extratos celulares para a separação por SDS-PAGE em condições redutoras. A eletroforese ocorreu inicialmente em amperagem de 60mA e aproximadamente uma hora depois do início da corrida, foi aumentada para 120mA. Em seguida, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membrana de PVDF, que foi lavada três vezes com TBS-Tween-20 0,1% e bloqueada com TBS-molico 5% por trinta minutos. Subsequentemente, foi incubada com anticorpo primário por 1h em temperatura ambiente ou overnight a 4°C. Em seguida, foi lavada três vezes com TBS-Tween-20 0,1% e incubada com anticorpo secundário por 1h em temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween-20 0,1% e as proteínas foram detectadas usando o substrato de quimioluminescência SuperSignal.

Anticorpos utilizados: anti-fosfo-AKT Ser 308 (Cell signaling), anti-AKT- total (Cell Signaling), anti-β-actina (Sigma-Aldrich), anti-Cofilina (Cell Signaling), anti- β-tubulina (Cell Signaling), anti-Lamina A/C (Cell Signaling).

## **Imunofluorescência Confocal**

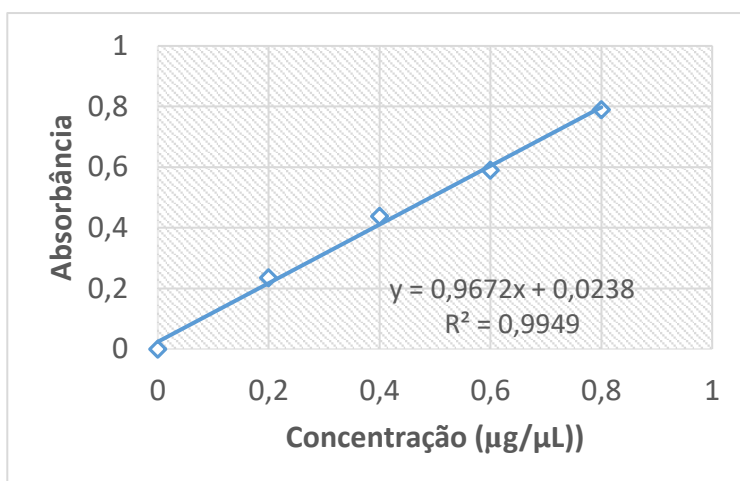
As células foram cultivadas em lamínulas em placas de 24 well. Para a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x gelado e fixadas com metanol gelado por 10 minutos, a -20°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x gelado e incubadas em tampão de bloqueio (Triton x 0,1%, soro de cabra 0,5% em PBS 1x) por 30 minutos. Após este período, as células foram tratadas com anticorpo específico diluídos 1:50 em tampão de bloqueio por 1 hora em uma câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x a intervalos de 5 minutos cada lavagem e então incubadas com anticorpo secundário diluídos 1:100 em tampão de bloqueio por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Após os tratamentos com anticorpos, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e incubadas por 1 minuto com solução DAPI (Molecular Probes – Invitrogen - D1306) para marcação do núcleo, e novamente lavadas três vezes com PBS 1x. Por fim, as lâminas foram montadas em Pro-Long antifade (Life Technologies, USA) e examinadas em microscópio de imunofluorescência confocal a laser no Laboratório de Microscopia Confocal – INFAR/UNIFESP. Todas as imagens confocais foram obtidas em objetivas de 63X, com excitação a 488 nm e observação a 505-550 nm para detectar Alexa 488, excitação a 543 nm e observação a 560-610 nm para detectar Alexa 555 e excitação a 633 nm e observação a 640-670 nm para detectar DAPI. A reconstrução tridimensional das séries de imunofluorescências confocais foram reconstituídas através do software ImageJ.

## RESULTADOS

### Determinação de cofilina no núcleo das células A2058

Células da linhagem A2058 foram cultivadas privadas de soro por 18h, e estimuladas ou não com soro fetal bovino por 30 minutos. Foram produzidos extratos citoplasmáticos e nucleares, os quais foram dosados (Fig.5) e submetidos a Western blot para determinação dessas proteínas.

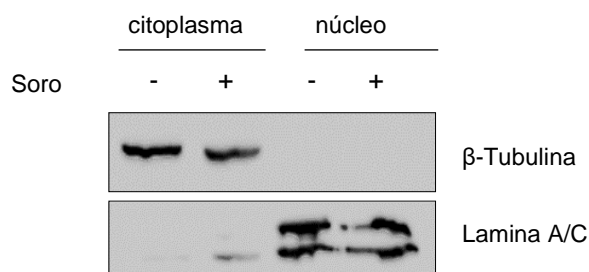
**Figura 5: Dosagem dos extratos.** Gráfico de absorbância x concentração referente à curva padrão de BSA. A partir da equação da reta, calcula-se a concentração dos extratos proteicos produzidos.



Após a extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares das células A5028, foi feita a avaliação da pureza dos extratos a partir da análise da distribuição de tubulina e lamina, que são marcadores citoplasmático e nuclear, respectivamente. Verificamos que a tubulina está presente exclusivamente no citoplasma, enquanto a lamina aparece altamente concentrada no núcleo (Fig.6). Além disso, a presença dos dois marcadores nesses compartimentos celulares independe do estímulo com soro.

**Figura 6: Distribuição de  $\beta$ -Tubulina e lamina A/C nos extratos nucleares e citoplasmáticos.**

Células A2058 foram cultivadas privadas de soro por 18h e então estimuladas (+) ou não (-) com soro por 30 minutos e extratos citoplasmáticos e nucleares foram produzidos e utilizados por Western blot para detecção  $\beta$ -Tubulina e lamina A/C.



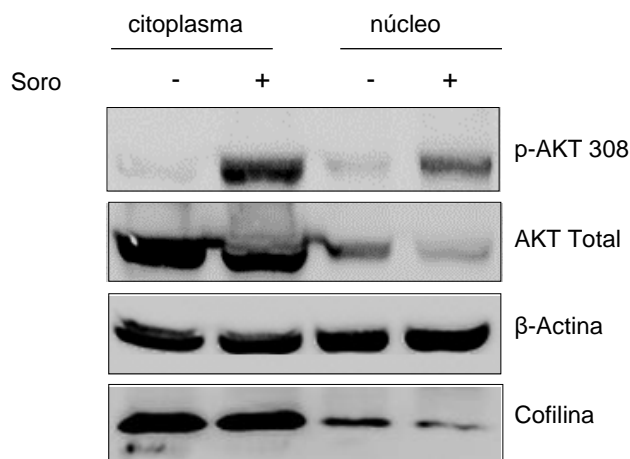
Uma vez confirmada a pureza dos extratos nucleares e citoplasmáticos, realizamos uma análise para determinação da presença de AKT,  $\beta$ -actina e cofilina no núcleo da linhagem A2058. Como pode ser observado na Fig. 7, o estímulo com soro induziu um aumento na fosforilação de AKT no citoplasma, o que foi acompanhado por uma maior presença de p-AKT no núcleo, sugerindo que AKT é translocado para o núcleo na forma fosforilada. Após a reutilização da membrana para a marcação com anticorpo anti-AKT total, que reconhece AKT independentemente do seu estado de fosforilação, observa-se a presença de AKT no núcleo tanto das células estimuladas com soro, como das células não estimuladas, mostrando que AKT se encontra no núcleo tanto na sua forma fosforilada como não fosforilada. Além disso, esse resultado sugere que o AKT não fosforilado presente no núcleo pode ser ativado diretamente nesse compartimento celular, uma vez que observamos aumento da forma fosforilado no núcleo após o estímulo com soro.

Ainda na Fig. 7, podemos observar a presença de bandas de intensidade similares da  $\beta$ -actina nos dois compartimentos, independentemente do estímulo com soro. A cofilina também aparece nos dois compartimentos, porém com menor intensidade no núcleo comparado com o citoplasma. Como demonstrado por Dopie et al., a translocação nuclear da  $\beta$ -actina depende da cofilina, com isso, a presença de  $\beta$ -actina no núcleo das células A2058 poderia ser explicada pela ação da cofilina. Além disso, tendo em vista que  $\beta$ -actina interage com AKT no núcleo das células A2058, a identificação de cofilina nuclear poderia indicar uma possível associação com o complexo AKT/ $\beta$ -actina, formando um complexo proteico composto por AKT/ $\beta$ -actina/cofilina.



**Figura 7: Determinação de p-AKT, AKT Total,  $\beta$ -actina e cofilina no citoplasma e núcleo celular.**

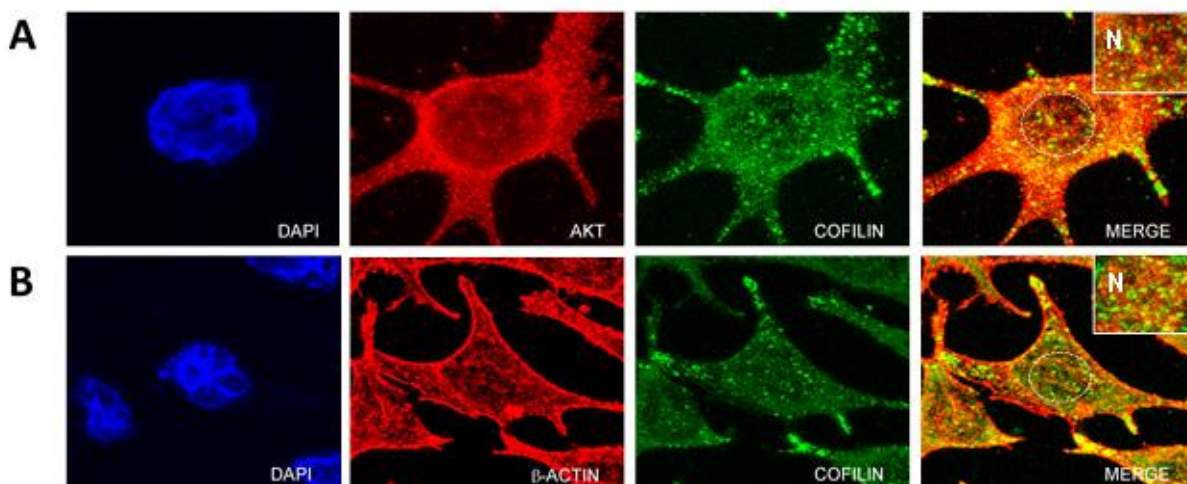
Células A2058 foram cultivadas privadas de soro por 18h e então estimuladas (+) ou não (-) com soro por 30 minutos e extratos citoplasmáticos e nucleares foram produzidos e utilizados por Western blot para detecção de p-AKT, AKT Total,  $\beta$ -actina e cofilina.



**Determinação da interação de cofilina com AKT e  $\beta$ -actina**

Para avaliar a interação da cofilina com AKT e  $\beta$ -actina, foram realizados experimentos de imunofluorescência, em que as células foram duplamente marcadas para cofilina e AKT ou cofilina e  $\beta$ -actina. Podemos observar que a cofilina se distribui tanto no citoplasma como no núcleo e que há pontos de colocalização entre cofilina e AKT (Fig.8A) nos dois compartimentos, bem como entre cofilina e  $\beta$ -actina (Fig. 8B). Esses resultados confirmam as observações realizadas através da análise por Western blot e sugerem a possibilidade da formação de um complexo proteico composto por AKT/ $\beta$ -actina/Cofilina, o qual estaria presente tanto no citoplasma como no núcleo. A imunofluorescência ilustra a distribuição das proteínas na extensão da célula e mostra detalhes sobre a localização das proteínas nos compartimentos. É possível notar que a cofilina se distribui de forma difusa entre o citoplasma e o núcleo, enquanto AKT e  $\beta$ -actina aparecem com grande intensidade na periferia do núcleo.

**Figura 8: Interação de cofilina com AKT e  $\beta$ -actina na células A2058.** Células A2058 foram duplamente marcadas para (A) cofilina e AKT ou (B) cofilina e  $\beta$ -actina. Foram utilizados anticorpos primários anti-cofilina (coelho), anti-AKT 1 (camundongo) e anti- $\beta$ -actina (camundongo), seguido de anticorpos secundários conjugados a Alexa 488 (verde) e 555 (vermelho). Após a dupla marcação, os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Marcadores estão indicados dentro de cada imagem. (Merge) corresponde à sobreposição de dois marcadores. (N) indica a região nuclear ampliada.



## DISCUSSÃO

A presença de AKT no compartimento nuclear foi descrita em alguns trabalhos, os quais demonstraram que AKT se encontra no núcleo de células de carcinoma hepatocelular, fibrosarcoma e células tumorais foliculares (Toker e Newton, 2000; Vasko *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2001). Apesar disso, não se sabe ao certo quais funções AKT exerce no compartimento nuclear. Para elucidar essa questão, diversos caminhos devem ser percorridos buscando, por exemplo, identificar proteínas com as quais AKT interage, a influência de seu estado de fosforilação e o mecanismo de sua translocação nuclear.

AKT não apresenta sequência de localização nuclear (NLS) conhecida, de forma que sua translocação para o núcleo provavelmente depende de uma proteína carreadora. A literatura é escassa sobre as bases moleculares envolvidas no transporte de AKT e, apesar de alguns trabalhos sugerirem diversos candidatos a esse papel mediador do transporte nuclear, essas evidências ainda não são conclusivas. Por exemplo, foi demonstrado em cardiomiócitos que a migração de AKT para o núcleo foi facilitada pela proteína do citoesqueleto Zyxin (Chan *et al.*, 2007). Em células endoteliais, a localização nuclear de AKT parece depender da GTPase RhoB (Adini *et al.*, 2003). A proteína “T-cell Leukemia-1” (TCL-1), uma proteína expressa durante o desenvolvimento de células T, foi identificada como uma proteína ligante de AKT, funcionando como um coativador de AKT e aumentando a sua translocação nuclear (Pekarsky *et al.*, 2000).

Experimentos de imunoprecipitação e espectrometria de massas realizados no nosso laboratório mostraram que AKT interage com  $\beta$ -actina no núcleo das células de melanoma humano da linhagem A2058 (Coa L.L. *et al.*, manuscrito submetido). Estudos mostraram que a actina está em constante movimentação entre o citoplasma e núcleo e que a sua entrada no núcleo é regulada pela importina 9 e cofilina (Dopie *et al.*, 2012), enquanto sua saída é regulada pela exportina 6 e profilina (Dopie *et al.*, 2012; Stuken, Hartmann e Gorlich, 2003). Considerando que a cofilina participa da translocação nuclear de actina, nós especulamos que o AKT poderia interagir com  $\beta$ -actina e cofilina concomitantemente, formando um complexo proteico, o qual poderia estar envolvido no transporte de AKT para o núcleo celular. Nossos experimentos de Western blot indicam a presença de AKT,  $\beta$ -actina e cofilina no citoplasma e núcleo e

os ensaios de imunofluorescência confocal demonstraram que a cofilina colocaliza com AKT e  $\beta$ -actina nos dois compartimentos das células A2058, sustentando nossa hipótese.

Observamos que a cofilina aparece com menor intensidade que a  $\beta$ -actina no núcleo, o que levanta questões sobre a correlação entre a concentração das duas proteínas, pois é esperado que elas estejam em quantidades similares no núcleo, visto que interagem durante o transporte nuclear. No entanto, a menor intensidade de cofilina no núcleo em relação à  $\beta$ -actina poderia ser explicada pela capacidade da cofilina de atravessar os poros nucleares, devido ao peso de apenas 19kDa (Bamburg, 1999). A cofilina pode ser considerada como regulador das funções nucleares de  $\beta$ -actina, já que a localização nuclear da  $\beta$ -actina se deve a essa proteína. Também foi demonstrado em estudo recente, que a cofilina interage com RNA polimerase II, em conjunto com a actina (Obrdlik e Percipalle, 2011), mostrando que a função dessa ABP não está limitada ao transporte nuclear da actina. Além disso, a cofilina interage com maior afinidade à actina ligada a ADP, quando comparada com actina ligada a ATP ou ADP+Pi (Bamburg, 1999; Bamburg e Bernstein, 2010) e ainda, para que a interação ocorra, a cofilina deve estar desfosforilada, uma vez que a sua fosforilação é regulada pelas quinases LimK (Arber *et al.*, 1998) e TesK (Toshima *et al.*, 2001) e a sua desfosforilação pela fosfatase Slingshot (Niwa *et al.*, 2002). Isso sugere que muitos fatores podem estar envolvidos na regulação do transporte de actina.

A presença de actina no compartimento nuclear está bem estabelecida na literatura, sabe-se que a actina é transportada pelo envelope nuclear na sua forma monomérica e que grande parte de suas funções nucleares são exercidas pela actina despolimerizada (Kristó *et al.*, 2016). Por exemplo, actina monomérica interage com ribonucleoproteínas e com o fator de alongamento B (pEFb), auxiliando, respectivamente, a ativação gênica e a transcrição (Grosse, R e Vartiainen, M. K., 2013). Contudo, actina filamentosa já foi detectada no núcleo em células U2OS (osteosarcoma humano) (Belin *et al.*, 2013) e em fibroblastos estimulados com soro (Baarlink *et al.*, 2013). A actina pode formar diversas estruturas quando polimerizada e muitas vias de sinalização podem estar envolvidas na regulação desse processo (Grosse, R e Vartiainen, M. K., 2013). Além disso, estudos sugerem que actina possui alguma função na regulação do transporte nuclear, pois foi demonstrado que ela se

associa com o complexo proteico do poro nuclear (Hofmann *et al.* 2001; Kiseleva *et al.* 2004).

Identificamos, a partir dos resultados de Western blot, que a presença de AKT no núcleo das células A2058 independe do seu estado de fosforilação, sugerindo que o transporte de AKT para o núcleo não requer atividade quinase. Contudo, esse resultado não é suficiente para esclarecer se o AKT é transportado independentemente de fosforilação ou se o AKT é fosforilado diretamente no núcleo.

Apesar de análises adicionais serem necessárias para comprovar que a translocação nuclear de AKT é de fato mediada pelo o complexo  $\beta$ -actina/cofilina, as observações apresentadas nesse trabalho sustentam nossa hipótese para os próximos passos. Além disso, é possível que outros mecanismos possam controlar a translocação nuclear de AKT. Por exemplo, foi demonstrado que a expressão da proteína “T-cell Leukemia-1” (TCL1) está envolvida na localização nuclear de AKT (Pekarsky *et al.*, 2000). Ainda, células de câncer de mama com níveis de TCL1 reduzidos apresentaram menor taxa de AKT nuclear, enquanto em células MCF-7 e células T47-D com aumento da expressão de TCL1 tiveram um nível maior de AKT nuclear (Badve *et al.*, 2010). Com isso, a alta frequência de AKT nuclear em células tumorais poderia ser explicada, tendo em vista que muitos tipos de tumores superexpressam TCL1 (Martelli *et al.*, 2012). Nossos achados levantam questões sobre a atuação do AKT no compartimento nuclear e muito ainda deve ser investigado para alcançarmos respostas para essas questões e compreender melhor sobre a importância dessa quinase no compartimento nuclear em patologias como o câncer.

## CONCLUSÃO

A partir dos ensaios de Western blotting, observamos:

- 1- A presença de AKT no núcleo de células A2058 independe de seu estado de fosforilação.
- 2- A  $\beta$ -actina se encontra no núcleo das células A2058 e seus níveis são similares no citoplasma e núcleo;
- 3- A cofilina se encontra no núcleo em níveis menores aos observados no citoplasma, independentemente do estímulo com soro;
- 4- Ensaios de imunofluorescência demonstraram que a cofilina colocaliza com  $\beta$ -actina e AKT tanto no citoplasma, como no núcleo.

No todo, esses resultados sugerem um possível envolvimento da cofilina em conjunto com a  $\beta$ -actina no transporte nuclear de AKT.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2011. Fundamentos da Biologia Celular. 3ª Edição. Editora Artmed.
- ADINI, I., RABINOVITZ, I., SUN, J. F., PRENDERGAST, G. C., & BENJAMIN, L. E. RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes & development*, 2003, 17.21: 2721-2732.
- ANDJELKOVIC, Mirjana et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 50, p. 31515-31524, 1997.
- ARBER, S., BARBAYANNIS, F. A., HANSER, H., SCHNEIDER, C., STANYON, C. A., BERNARD, O., & CARONI, P. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, v. 393, n. 6687, p. 805-9, Jun 1998.
- ASTOUL, E.; WATTON, S.; CANTRELL, D. The dynamics of protein kinase B regulation during B cell antigen receptor engagement. *J Cell Biol*, v. 145, n. 7, p. 1511-20, Jun 28 1999.
- BADVE, S., COLLINS, N. R., BHAT-NAKSHATRI, P., TURBIN, D., LEUNG, S., THORAT, M., & BOSE, S.. Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor-and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications. *The American journal of pathology*, v. 176, n. 5, p. 2139-2149, 2010.
- BAMBURG, James R. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 15, n. 1, p. 185-230, 1999.

- BAMBURG, James R.; BERNSTEIN, Barbara W. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol Rep*, v. 2, n. 62.10, p. 3410, 2010.
- BORGATTI, P., MARTELLI, A. M., BELLACOSA, A., CASTO, R., MASSARI, L., CAPITANI, S., & NERI. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett*, v. 477, n. 1-2, p. 27-32, Jul 14 2000.
- BORGATTI, P., MARTELLI, A. M., TABELLINI, G., BELLACOSA, A., CAPITANI, S., & NERI, L. M. Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin. *J Cell Physiol*. 196(1):79-88, Jul 2003.
- BURGERING, B. M.; MEDEMA, R. H. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 73, n. 6, p. 689-701, Jun 2003.
- CHAN, C. B., LIU, X., TANG, X., FU, H., & YE, K. Akt phosphorylation of zyxin mediates its interaction with acinus-S and prevents acinus-triggered chromatin condensation. *Cell Death & Differentiation*, v. 14, n. 9, p. 1688-1699, 2007.
- DHANASINGH, I., CHOI, J. M., & LEE, S. H. (2015). Karyopherins and Nuclear actin transport. *Biodesign*, 3, 88-97.
- DAVIES, M. A., STEMKE-HALE, K., TELLEZ, C., CALDERONE, T. L., DENG, W., PRIETO, V. G., & MILLS, G. B. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *British journal of cancer*, v. 99, n. 8, p. 1265-1268, 2008.
- DIENSTMANN, R., RODON, J., SERRA, V., & TABERNERO, J. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*, v. 13, n. 5, p. 1021-1031, 2014.
- DOPIE, J., SKARP, K. P., RAJAKYLÄ, E. K., TANHUANPÄÄ, K., & VARTIAINEN, M. K. Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, n. 9, p. E544-52, Feb 2012.
- GOEL, V. K., LAZAR, A. J., WARNEKE, C. L., REDSTON, M. S., & HALUSKA, F. G. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 126, n.1, p. 154-160, 2006.
- GROSSE, Robert; VARTIAINEN, Maria K. To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 14, n. 11, p. 693, 2013.
- HOFMANN, W., REICHART, B., EWALD, A., MÜLLER, E., SCHMITT, I., STAUBER, R. H., DABAUVALLE, M. C. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of rev response element (RRE)– and constitutive transport element (CTE)–containing retroviral RNAs: an unexpected role for actin. *The Journal of cell biology*, 152(5), 895-910.
- KIM, D., KIM, S., KOH, H., YOON, S. O., CHUNG, A. S., CHO, K. S., & CHUNG, J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *The FASEB Journal*, v. 15, n. 11, p. 1953-1962, 2001.
- KISELEVA, E., DRUMMOND, S. P., GOLDBERG, M. W., RUTHERFORD, S. A., ALLEN, T. D., & WILSON, K. L. (2004). Actin-and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *Journal of cell science*, 117(12), 2481-2490.
- KRISTÓ, Ildikó et al. Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus. *Histochemistry and cell biology*, v. 145, n. 4, p. 373-388, 2016.

- MANNING, Brendan D.; CANTLEY, Lewis C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, v. 129, n. 7, p. 1261-1274, 2007.
- MARTELLI, A. M., TABELLINI, G., BRESSANIN, D., OGNIBENE, A., GOTO, K., COCCO, L., & EVANGELISTI, C. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*, v. 1823, n. 12, p. 2168-78, Dec 2012.
- MAYO, M. W.; BALDWIN, A. S. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta*, v. 1470, n.2, p. M55-62, Mar 27 2000.
- MAYO, Lindsey D.; DONNER, David B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 20, p. 11598-11603, 2001.
- MEIER, R., ALESSI, D. R., CRON, P., ANDJELKOVIĆ, M., & HEMMINGS, B. A. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem*, v. 272, n. 48, p. 30491-7, Nov 28 1997.
- NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, v. 14, n. 5, p. 381-95, May 2002.
- NGUYEN, T. L. X., CHOI, J. W., LEE, S. B., YE, K., WOO, S. D., LEE, K. H., & AHN, J. Y. Akt phosphorylation is essential for nuclear translocation and retention in NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 349, n. 2, p. 789-98, Oct 2006.
- NIWA, R., NAGATA-OHASHI, K., TAKEICHI, M., MIZUNO, K., & UEMURA, T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, v. 108, n. 2, p. 233-46, Jan 2002.
- OBRDLIK, Ales; PERCIPALLE, Piergiorgio. The F-actin severing protein cofilin-1 is required for RNA polymerase II transcription elongation. *Nucleus*, v. 2, n. 1, p. 72-79, 2011.
- OLAVE, Ivan A.; RECK-PETERSON, Samara L.; CRABTREE, Gerald R. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annual review of biochemistry*, v. 71, n. 1, p. 755-781, 2002.
- PEDERSON, Thoru; AEBI, Ueli. Actin in the nucleus: what form and what for?. *Journal of structural biology*, v. 140, n. 1, p. 3-9, 2002.
- PEKARSKY, Y., KOVAL, A., HALLAS, C., BICHI, R., TRESINI, M., MALSTROM, S., ... & CROCE, C. M. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 7, p. 3028-3033, 2000.
- PERCIPALLE, P., JONSSON, A., NASHCHEKIN, D., KARLSSON, C., BERGMAN, T., GUALIS, A., & DANEHOLT, B. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic acids research*, v. 30, n. 8, p. 1725-1734, 2002.
- POLLARD, Thomas D.; BELTZNER, Christopher C. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Current opinion in structural biology*, v. 12, n. 6, p. 768-774, 2002.
- POLLARD, Thomas D.; BORISY, Gary G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, v. 112, n. 4, p. 453-465, 2003.
- POLLARD, Thomas D.; COOPER, John A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annual review of biochemistry*, v. 55, n. 1, p. 987-1035, 1986.
- SAJI, M., VASKO, V., KADA, F., ALLBRITTON, E. H., BURMAN, K. D., & RINGEL, M. D. Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 332, n. 1, p. 167-73, Jun 2005.



- SALINAS, M., LÓPEZ-VALDALISO, R., MARTÍN, D., ALVAREZ, A., & CUADRADO, A. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol Cell Neurosci*, v. 15, n. 2, p. 156-69, Feb 2000.
- SCHEID, M. P.; WOODGETT, J. R. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 2, n. 10, p. 760-8, Oct 2001.
- SCHLUTER, Kathrin; JOCKUSCH, Brigitte M.; ROTHKEGEL, Martin. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1359, n. 2, p. 97-109, 1997.
- SMALLEY, Keiran SM. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *Journal of Investigative Dermatology*, v.130, n. 1, p. 28-37, 2010.
- STEELMAN, L. S., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., KEMPF, C. R., LONG, J., LAIDLER, P., & DONIA, M. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*, v. 3, n. 3, p. 192, 2011.
- STUVEN, Theis; HARTMANN, Enno; GÖRLICH, Dirk. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin- actin complexes. *The EMBO journal*, v. 22, n. 21, p. 5928-5940, 2003.
- TERRY, Laura J.; SHOWS, Eric B.; WENTE, Susan R. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science*, v. 318, n. 5855, p. 1412-1416, 2007.
- TOKER, A.; NEWTON, A. C. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem*, v. 275, n. 12, p. 8271-4, Mar 24 2000.
- TOSHIMA, J., TOSHIMA, J. Y., AMANO, T., YANG, N., NARUMIYA, S., & MIZUNO, K. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*, v. 12, n. 4, p. 1131-45, Apr 2001.
- VASKO, V., SAJI, M., HARDY, E., KRUEHLAK, M., LARIN, A., SAVCHENKO, V., & BURMAN, K. D. AKT activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet*, v. 41, n. 3, p. 161-70, Mar 2004.
- XU, Yong Zhong; KANAGARATHAM, Cynthia; RADZIOCH, Danuta. Exploring Secrets of Nuclear Actin Involvement in the Regulation of Gene Transcription and Genome Organization. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- WANG, Ruiwen; BRATTAIN, Michael G. AKT can be activated in the nucleus. *Cellular signalling*, v. 18, n. 10, p. 1722-1731, 2006.
- WULLSCHLEGER, Stephan; LOEWITH, Robbie; HALL, Michael N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, v. 124, n. 3, p. 471-484, 2006.
- ZHOU, B. P., LIAO, Y., XIA, W., ZOU, Y., SPOHN, B., & HUNG, M. C. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology*, v. 3, n. 11, p. 973-982, 2001.